



Avaliação do crescimento de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido microbiolizadas com *Pantoea agglomerans*

Renato Luís Vieira¹, Leandro Luiz Marcuzzo², Giuliano Dragone Sabbatino Calmont de Andrade³

Resumo – O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da bactéria *Pantoea agglomerans* sobre o crescimento de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. A bactéria foi multiplicada em meio de cultura 523 de Kado & Heskett e após 24 horas preparou-se suspensão bacteriana em NaCl 0,85% ajustada em OD₅₅₀=0,5, enquanto para controle foi utilizada somente solução salina. Plantas micropropagadas foram microbiolizadas durante 1 hora e após foram transplantadas em bandejas de isopor contendo mistura de substrato Plantmax[®] e cinza vegetal na relação 1:1 (v/v), mais 0,5ml de suspensão bacteriana aplicada no colo da plântula. Aos 30 dias, após a transferência para o substrato, observou-se um aumento de 29,62% na porcentagem de sobrevivência nas plantas microbiolizadas, além de um incremento de 50% na altura de plantas. Com relação à massa fresca e seca, a bactéria proporcionou aumento de 53,09% e 52,94% na parte aérea e um incremento de 103,28% e 66% no sistema radicular, respectivamente. A bactéria *Pantoea agglomerans* promove o crescimento de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas.

Termos para indexação: micropropagação, cultura *in vitro*, bactéria promotora de crescimento.

Evaluation of the growth of Marubakaido micropropagated apple rootstock microbiolized with *Pantoea agglomerans*

Abstract – This research aimed to evaluate the effect of the bacteria *Pantoea agglomerans* to promote growth of micropropagated apple rootstocks. The bacteria was multiplied in culture media 523 of Kado & Heskett and 24 hours later the bacterial suspension was prepared in NaCl 0.85% and adjusted in OD₅₅₀ = 0.5, while for control, only saline solution was used. Micropropagated apple rootstocks were microbiolized during 1 hour and transplanted in polystyrene trays containing substratum mixture Plantmax[®] and vegetable ash at the rate of 1:1 (v/v), plus 0.5ml of bacterial suspension applied in the soil for each seedling. After 30 days an increase of 29.61% in the survival of microbiolized seedlings, and an increment of 50% in the height was observed, when compared to the control. Regarding the fresh and dry weight, in the aerial part, the bacteria provided an increase of 53.09% and 52.94% and an increment of 103.28% and 66% for the root system, respectively. The bacteria *Pantoea agglomerans* promotes growth of seedlings of Marubakaido micropropagated apple rootstock and may be indicated to inoculate plants produced by micropropagation.

Index terms: microbiolization, *in vitro* culture, bacteria growth promoter.

Aceito para publicação em 25/2/08.

¹Eng. agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Caçador, C.P. 591, 89500-000 Caçador, SC, fone: (49) 3561-2000, e-mail: revieira@epagri.sc.gov.br.

²Eng. agr., M.Sc., Universidade do Contestado, Campus Universitário de Caçador, C.P. 291, 89500-000, Caçador, SC, fone: (49) 3561-6200, e-mail: marcuzzo@conection.com.br.

³Estudante de Engenharia da Horticultura, Universidade do Contestado, fone: (49) 3561-6200, e-mail: gdraga6@hotmail.com.

Introdução

O uso de porta-enxerto é importante na produção de frutíferas, controlando o vigor da planta e oferecendo resistência a patógenos e adaptação a diferentes condições de solo e de clima. O porta-enxerto de macieira da cultivar Marubakaido é um dos porta-enxertos mais utilizados no Brasil, caracterizando-se por ser vigoroso, de produção precoce, resistente à podridão-do-colo e moderadamente resistente à *Rosellinia* spp., porém sensível a viroses (Soejima et al., 1998).

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade de propagação dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e apresentado aplicações práticas comprovadas (Hartmann et al., 1997). Entretanto, o seu emprego em escala comercial na produção de mudas pode ser limitado devido, entre outros fatores, às etapas de enraizamento e aclimatização de plantas. Ao serem retiradas das condições *in vitro* e transferidas para o substrato, as plantas ficam mais sensíveis às condições climáticas adversas e suscetíveis ao ataque de fitopatógenos (Albuquerque et al., 2003). Desta forma, os benefícios deste método, como o desenvolvimento precoce da planta, ficam comprometidos.

A microbiolização, definida como a aplicação de microrganismos vivos na planta para o controle de doenças e/ou para promover o crescimento (Luz, 1996), pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da micropropagação. Apesar de bem estabelecidas como produtos biológicos para controle biológico de doenças e pragas (Mariano et al., 2004), o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) em mudas micropropagadas ainda está em fase de desenvolvimento. Dentre os trabalhos já realizados, alguns isolados bacterianos associados a espécies micropropagadas mostraram-se eficientes: em mudas de abacaxizeiro, os isolados *Asaia bogorenses* e *Burkhol-*

deria cepacia (Weber et al., 2003), e em mudas de bananeira os isolados *Bacillus* spp. (Albuquerque et al., 2003) e *Herbaspirillum* spp. (Weber et al., 2000). Por outro lado, Marcuzzo et al. (2005) constataram a presença de colônias de bactérias sobre meios de cultura para micropropagação de porta-enxertos de macieira, identificando entre elas a *Pantoea agglomerans* (Gavini et al., 1989), e evidenciaram um crescimento diferenciado entre as plantas que desenvolviam nestes meios, indicando que novos estudos deveriam ser conduzidos para constatar de que forma esta bactéria estaria interagindo com as plântulas.

De acordo com Conn et al. (1997) e Lazarovits & Nowak (1997), as BPCP atuam promovendo diretamente o crescimento, pela produção de ácido cianídrico, fitormônios, enzimas como a ACC-deaminase, e o aumento da absorção pelas raízes, entre outros. Os efeitos benéficos das BPCP sobre mudas micropropagadas são, principalmente, o aumento da área foliar, do diâmetro de pseudocaule, do número de folhas e da massa seca, com consequente redução do tempo de aclimatização e aumento da sobrevivência das mudas após o transplante (Mariano et al., 2004).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da microbiolização com a bactéria *Pantoea agglomerans* sobre o crescimento de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Epagri/Estação Experimental de Caçador, onde mini-estacas de porta-enxertos de macieira Marubakaido, previamente micropropagadas, foram repicadas em frascos contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com mio-inositol (100mg/L), sacarose (40g/L) e ácido indolacético (1mg/L), ajustado a pH 5,8 e autoclavado (121°C por 15 mi-

nutos). Posteriormente, os frascos com as plantas foram colocados em sala de crescimento, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $75\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Após 30 dias, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas com água corrente e em seguida microbiolizadas durante 1 hora em suspensão salina (NaCl 0,85%) de *Pantoea agglomerans* previamente cultivada em meio de cultura Kado & Heskett (1970) por 24 horas a 28°C , cuja concentração foi ajustada em espectrofotômetro $\text{OD}_{550} = 0,5$. Na sequência, as plantas foram transplantadas em bandejas de isopor contendo uma mistura de substrato Plantmax^a (Eucatex) e cinza vegetal obtida da indústria madeireira, na proporção de 1:1 (v/v) sendo adicionado ainda 0,5ml de suspensão bacteriana no colo da planta. Como testemunha utilizaram-se plantas imersas por igual período em suspensão salina. As bandejas foram depositadas em caixa de plástico fechada nas laterais, cobertas com uma tampa de vidro e mantidas em sala climatizada a 25°C e fotoperíodo de 16 horas, durante 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por 20 plantas. As seguintes variáveis foram avaliadas aos 30 dias após a transferência das plantas para o substrato: porcentagem de plantas sobreviventes, peso da massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. Também foi avaliada a altura de plantas aos 15 e 30 dias após a transferência para o substrato. As diferenças obtidas entre os tratamentos (*P. agglomerans* e testemunha) foram expressas em porcentagem, calculadas da seguinte forma: para cada variável analisada foi calculada a diferença entre as médias dos dois tratamentos e esta diferença foi transformada em porcentagem, sendo a transformação feita por regra de três, em relação à menor média.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. ►

Resultados e discussão

Constatou-se que as plantas microbiolizadas com a bactéria *Pantoea agglomerans* apresentaram sobrevivência 29,62% superior à testemunha (Tabela 1), o que indica o potencial do uso desta bactéria durante a fase de aclimatização para proporcionar a obtenção de maior número de plantas aclimatizadas e com maior vigor, como pode ser observado na Figura 1. Weber et al. (2003) observaram efeito semelhante utilizando a bactéria *Asaia bogorenses* em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cultivar Cayenne Champac, constatando uma taxa média de sobrevivência de 98,8% durante a fase de aclimatização.

Quanto à altura de plantas, foi constatado nas plantas microbiolizadas incremento significativo, da ordem de 50% aos 30 dias após a transferência para o substrato, sendo que não houve diferença estatística aos 15 dias (Figura 2). O incremento obtido, no intervalo de 15 aos 30 dias, nas plantas microbiolizadas com *Pantoea agglomerans* foi de 116,1%, contra 51,5% na testemunha.

Resultados semelhantes foram constatados por Siqueira (1999), que, ao utilizar o isolado de *Bacillus megaterium*, obteve aumento de 106,7% na altura de mudas micropropagadas de abacaxizeiro e por Weber et al. (2000), que, utilizando *Herbaspirillum* e *Burkholderia cepacia* em bananeira, obtiveram incremento de 100,4%, também na altura de mudas.

Para o peso de massa fresca e seca da parte aérea, verificaram-se incrementos de 53,1% e 52,9%, respectivamente, em relação à testemunha não microbiolizada (Tabela 1). Aumento na massa seca da parte aérea também foi observado por Weber et al. (2003), quando utilizaram a microbiolização com *Burkholderia cepacia* em mudas micropropagadas de abacaxi. Outros trabalhos, ainda com plantas micropropagadas de abacaxi, tam-

Tabela 1. Peso (mg) da massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e taxa de sobrevivência de porta-enxertos micropropagados de macieira Marubakaido com e sem microbiolização por *Pantoea agglomerans*, aos 30 dias após a transferência para o substrato⁽¹⁾

Tratamento	Parte aérea		Sistema radicular		Taxa de sobrevivência (%)
	Massa fresca	Massa seca	Massa fresca	Massa seca	
<i>P. agglomerans</i>	124,0 a	26,0 a	62,0 a	8,3 a	94,97
Testemunha	81,0 b	17,0 b	30,5 b	5,0 b	73,27
CV (%)	15,28	14,29	12,94	16,01	15,86

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

CV = coeficiente de variação.



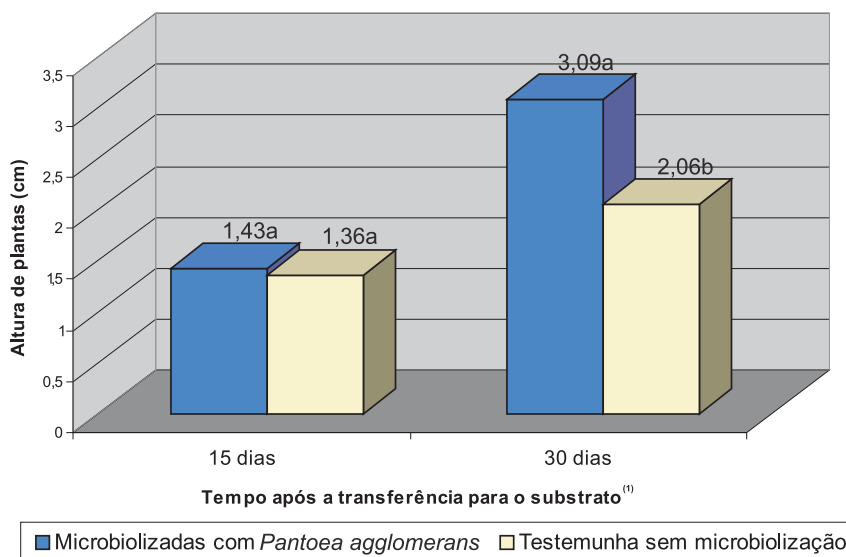
Figura 1. Plantas de porta-enxertos de macieira Marubakaido micropropagadas e aclimatizadas: testemunha (fileira A) e microbiolizadas com *Pantoea agglomerans* (fileira B)

bém reportam um aumento do acúmulo de massa seca da parte aérea quando microbiolizadas com *Bacillus* sp.: da ordem de 163,6% (Mello et al., 2002), e da ordem de 40,7% quando *Bacillus subtilis* é utilizada (Siqueira et al., 1999).

Quanto ao peso da massa fresca e seca do sistema radicular, estes apresentaram um aumento de 103,3% e 66%, respectivamente, quando plantas microbiolizadas com *Pantoea agglomerans* foram comparadas à testemunha aos 30 dias após a transferência para o substrato

(Tabela 1). Na mesma linha de trabalho, Mello et al. (2002) avaliaram o efeito da inoculação do isolado bacteriano *Asaia bogorensis* em plantas de abacaxizeiro da cultivar Pérola e constataram aumento médio de 26,5% na produção de massa seca do sistema radicular e de até 100,3% quando utilizaram em mistura os isolados *Bacillus thuringiensis* subvar. *kurstakii*, *Bacillus* sp., *B. pumilus* e *B. cereus*.

Da mesma forma que nos demais trabalhos relatados, os resultados referentes a incrementos de massa



(¹) Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo Teste de F a 5% de significância.

Figura 2. Altura de plantas micropropagadas de porta-enxertos de macieira Marubakaido aos 15 e 30 dias após a transferência para o substrato com e sem microbiolização

seca da parte aérea e do sistema radicular são comparáveis aos obtidos neste trabalho e compartilham com os relatos de Mariano et al. (2004) sobre a importância e os benefícios das BPCP na micropropagação de plantas de diversas espécies.

Conclusões

A bactéria *Pantoea agglomerans* promove o crescimento de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas. Portanto, pode ser indicada para microbiolizar plantas produzidas pelo método de micropropagação com o objetivo principal de aumentar a taxa de sobrevivência na fase de aclimatização.

Literatura citada

- ALBUQUERQUE, V.V.; TERAQ, D.; MARIANO, R.L.R. et al. Growth-promotion and biocontrol of Fusarium wilt in micropropagated plantlets of *Musa* sp. In: PROCEEDING OF THE INTERNATIONAL PGPR WORKSHOP, 6., 2003, Calicut, India.

- Abstracts... Calicut, India: Indian Institute of Spices Research, 2003. p.3-7.
- CONN, K.L.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G.A. et al. Genotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, n.9 p.801-808, 1997.
- GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A. et al. Transfer of Enterobacter agglomerans (Beijerinck, 1988) Ewing and Fife, 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* com. Nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.39, n.3, p.337-345, 1989.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVES JÚNIOR, F.T. et al. *Plant propagation: principle and practices*. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.24-30, 1970.
- LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacterium for improvement of

plant growth and establishment. *Hortscience*, v.32, p.188-192, 1997.

- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.4, p.1-49, 1996.
- MARCUZZO, L.L.; ANDRADE, G.D. S.C.; VIEIRA, R.L. Ocorrência, isolamento e identificação de *Pantoea agglomerans* em porta-enxertos de macieira obtidos através de micropropagação in vitro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.31, supl., p.12-103, 2005.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, v.1, p.89-111, 2004.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M. et al. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.28, p.222-228, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- SIQUEIRA, K.M.S. Promoção de crescimento de mudas de abacaxi através da utilização de bactérias. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.256, 1999.
- SOEJIMA, J.; BESSHO, H.; KOMORI, S. et al. New apple rootstocks, ARM 1, ARM 7 AND ARM 8. *Acta Horticulturae*, v.484, p.217-220, 1998.
- WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. et al. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.35, n.11, p.2227-2285, 2000.
- WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, S.R.M. et al. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.6, p.689-696, 2003. ■